Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

# Intrazellulärer Wirkungsmechanismus von Bis-hydroxymethyl-peroxyd am Ehrlichschen Mäuseascites-Carzinom unter in-vivo-Bedingungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Uwe Klominsky
aus Böhmisch Leipa

1964

7959

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. Dr. G. Weitzel

# Intrazellulärer Wirkungsmechanismus von Bis-hydroxymethyl-peroxyd am Ehrlichschen Mäuseascites-Carzinom unter in-vivo-Bedingungen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Uwe Klominsky
aus Böhmisch Leipa

1964

Dekan: Professor Dr.med. H. Harms
1. Berichterstatter: Professor Dr.med. Dr.rer.nat. G. Weitzel
2. Berichterstatter: Professor Dr.med. F. Lembeck

Fotodruck PRÄZIS · Tübingen

Die vorliegende Arbeit entstand im WS 1961/62 und im SS 1962 im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen.

Herrn Prof.Dr.Dr.G.Weitzel danke ich für die Überlassung des Themas und für die freundliche und großzügige Unterstützung meiner Untersuchungen.
Ebenso gilt mein Dank den Mitarbeitern des Physiologisch-Chemischen Instituts,die mich mit Hinweisen unterstützten, namentlich Herrn Doz.Dr.E.Buddecke,der mich in die Methodik der Metabolitbestimmungen einführte,Herrn Doz.Dr.F.Schneider, aus dessen Labor Bis-hydroxymethyl-peroxyd stammte und Herrn Dr.K.Seynsche,der durch seine Unterstützung die exakte Durchführung der Tierversuche möglich machte.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547607_0013

# I N H A L T


Seite

Einleitung und Problemstellung 1

Methodik:

1) Ascitesextraktherstellung 3

2) Metabolitbestimmungen 3

3) Zellvolumenbestimmung 7

4) Aufbau der Tierversuche 7

5) Isotopenversuche 8

Ergebnisse:

I. Wirkung des Peroxyds auf Metabolite des Energiestoffwechsels in vivo 12

II. Wirkung des Peroxyds auf Metabolite in vitro 14

III. Reversibilität der Peroxydwirkungen 15

IV. Kurzzeitversuch und Praemedikation von Nicotinamid 18

V. Halbwertszeit des NAD (Isotopenversuch I) 20

VI. Veränderungen im Einbau von radioaktivem Material in bestimmte Metabolite durch Peroxydgabe(Isotopenversuch II) 21

VII. Zusammenhänge zwischen NAD-und NA-Konzentrationsänderungen 24

Diskussion 26

Zusammenfassung 30

Abkürzungen 31

Schrifttumsverzeichnis 32

## Einleitung und Problemstellung

Bestimmte organische Peroxyde wirken cytostatisch;so verhindert z.B. das Bis-hydroxymethyl-peroxyd das Wachstum des Mäuseascites-Carzinoms. (1,2) Die Hemmung des Wachstums der Krebszellen und die Fähigkeit der wirksamen Peroxyde,geeignete Substanzen wie z.B. die Thiazolidincarbonsäure zu oxydieren,gehen parallel.(Die Reaktion wurde zum sogenannten ‚Thiazolidintest'(2)ausgearbeitet.)Dabei ist die Oxydationsgeschwindigkeit von entscheidender Bedeutung.Allein die Peroxyde,die im Thiazolidintest mehr als 40% ihres Sauerstoffs innerhalb von einer Stunde abgeben (wie z.B.auch das Bis-hydroxymethyl-peroxyd),zeigen cytostatische Effekte(2).Glykolysefermente wie Hexokinase,Aldolase sowie GAPDH sind in vitro gegenüber Bishydroxymethyl-peroxyd hochempfindlich(3),die Fermentaktivität wird durch das Peroxyd stark vermindert.Ferner werden Atmung und anaerobe Glycolyse von Asciteszellen in Warburgversuchen in demselben Ausmaß gehemmt,wie man es auch bei Alkylierungsmitteln antrifft(1,4).

Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es,den intrazellulären Wirkungsmechanismus des Bis-hydroxymethyl-peroxyds am Ehrlichschen Mäuseascites-Carzinom in vivo zu untersuchen.
Als Indikatoren der intrazellulären Peroxydwirkung dienten Konzentrationsänderungen von Metaboliten,die im Energiestoffwechsel der Zelle eine Rolle spielen.Es wurden folgende Metabolite quantitativ bestimmt: NAD,ATP,FDP,TP,NA,NS,NR,NAM,APPR sowie die Gesamtpyridinnukleotide.

Im Abschnitt I der Arbeit wird untersucht,wie sich der Metabolitgehalt in 1cm$^3$ Zellvolumen ändert,wenn man in vivo 1 Stunde nach Injektion von Bis-hydroxymethyl-peroxyd den Ascites entnimmt.

Im Abschnitt II wird untersucht,ob die Änderungen der Metabolitkonzentrationen im Ascites durch einen direkten Angriff des Peroxyds am Metabolitmolekül zustande kommen.Man prüfte in vitro,ob NAD,NA und NS direkt vom Peroxyd angegriffen werden.

Abschnitt III befaßt sich mit der Frage,ob die Konzentrationsänderungen der untersuchten Metabolite im Ascites irreversibel beharren,oder aber im Laufe der Zeit wieder rückgängig gemacht werden.Man bestimmte deshalb den Metabolitgehalt des Ascites zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Peroxydapplikation.

Im Abschnitt IV wird geprüft,ob zwischen den Veränderungen der Konzentrationen einiger Metabolite kausale Zusammenhänge bestehen,ob z.B.auch dann noch Konzentrationsänderungen nachweisbar sind,wenn man den NAD-Gehalt durch Applikation von Nicotinamid nach der Peroxydgabe auf dem normalen Niveau hält.Zugleich interessierte in diesem Zusammenhang,welche Metabolitkonzentrationen zuerst geändert werden, und wie rasch diese Änderungen erfolgen.

Im Abschnitt V wird über die Bestimmung der biologischen Halbwertszeit des NAD in der Asciteszelle unter in-vivo-Bedingungen berichtet. (Applikation von 3,3µC 14C-U-Glukose pro Ascitesmaus.)

Abschnitt VI befaßt sich mit der Frage,wie sich die Inkorporierung von radioaktivem Material in NAD,NAM,NR und AMP ändert,wenn man einerseits nicht behandelt,andererseits das Peroxyd injiziert. (Applikation von 4,5µC 14C-U-Glukose pro Ascitesmaus.)
Abschließend werden im Abschnitt VII die Zusammenhänge untersucht, welche zwischen den Konzentrationsänderungen von NAD und NA nach Peroxydbehandlung bestehen.

## Methodik

### 1.Ascitesextraktherstellung

Die Zellaufbereitung gliedert sich in 3 Abschnitte:

a) Kältestop des Zellstoffwechsels
b) Metabolitextraktion aus den Zellen mit Perchlorsäure
c) Neutralisation des Extraktes mit KOH.

Der Nativascites wird unmittelbar nach der Entnahme in einer Kältemischung von -3° C gekühlt.Darauf wird die Metabolitextraktion mit eiskalter Perchlorsäure (10%ig) durchgeführt.Dabei muß man beachten, daß die Perchlorsäure in dem Ascites-Säuregemisch oder(bei Verdünnung) im Ascites-Ringer-Säuregemisch immer eine Endkonzentration von 3,3% hat.Wir lassen die Perchlorsäure unter Rühren 15 Minuten bei 0° C auf die Zellen einwirken,bevor wir den Zelldetritus mit dem denaturierten Plasmaeiweiß in der Kühlzentrifuge bei 15000 U/Minute abzentrifugieren.Der Überstand wird mit einer konzentrierten KOH-Lösung mittels einer Syringe exakt auf den pH-Wert von 6,5 eingestellt.Bei der Titration der Perchlorsäure mit der Lauge wird der Überstand ständig mit einem Magnetrührer durchmischt.Dadurch wird vermieden,daß lokal der pH-Wert stark ansteigt. Nach dem Abzentrifugieren des ausgefallenen $KClO_4$ werden verschiedene Mengen des Überstandes für die einzelnen Metabolitbestimmungen eingesetzt.

### 2.Metabolitbestimmungen

#### A) Quantitative Enzymatisch-Optische Methoden

##### I.NAD-Bestimmung

Reagentien: Semicarbazid-hydrochlorid(0,5gr/50ml H20) (im Volumenverhältnis 1:1 gemischt
unvergällter Alkohol (96%ig)
Phosphatpuffer (pH 7,2)
ADH Kristallsuspension der Fa.Boehringer 1:15 verdünnt

**Ausführung:**
4ml Ascitesextrakt werden mit 3,3ml Phosphatpuffer und 0,6ml Alkohol-semicarbazid vermischt.Die Reaktion wird mit 0,1ml ADH-Suspension gestartet.Bei 334nm wird im Eppendorf(5cm Küvette) die Extinktionszunahme ermittelt.Es genügt völlig,wenn man die Reaktion 10 Minuten ablaufen läßt und dann die Extinktionszunahme ermittelt,da die Fermentreaktion bereits vor dieser Zeit zum Stillstand kommt.
An Hand von Eichkurven sieht man,daß nach Perchlorsäurebehandlung nur ein geringer Verlust an NAD eintritt.

Berechnung:

$$Ext \cdot 22,8 \cdot 2 \cdot \frac{\ddot{U}}{A} = \mu g \text{ NAD/ml Nativascites}$$

Bei der Eichung mit NAD der Fa.Boehringer u. Soehne(Mannheim)wurde berücksichtigt,daß das Firmenpräparat nur 85,5% β-isomeres NAD enthält.

$\ddot{U}$ = Gesamtüberstand nach Neutralisation (in ml)
A = Nativascites (in ml),der mit Perchlorsäure extrahiert wurde
Ext = Extinktionszunahme

II.ATP-Bestimmung

Wir verwenden den Bestimmungstest für ATP der Firma Boehringer u.Soehne(Mannheim).Firmenkennwort TC-J.Bei der folgenden Berechnung halten wir uns an den Extinktionskoeffizienten,der von der Firma für eine Wellenlänge von 366nm angegeben wird.

$$Ext \cdot 411,8 \cdot 5 \cdot \frac{\ddot{U}}{A} = \mu g \text{ ATP/ml Nativascites}$$

Unter Perchlorsäurebehandlung tritt kein ATP-Verlust ein.

III.FDP-Bestimmung

Reagentien: m/20 TRA-Puffer (pH 7,6)
$Na_2HAsO_4 \cdot 7H_2O$ (5,4%ige Lösung)
NAD-Lösung (1%ig)
GAPDH-Kristallsuspension der Fa.Boehringer 1:5 verdünnt
ALD - " " " " " "

Ausführung:
4ml Ascitesextrakt werden mit 3,6ml TRA Puffer und 0,1ml Arsenat sowie 0,1ml GAPDH-Suspension vermischt.Der Start erfolgt mit 0,1ml ALD.Die Extinktionszunahme wird bei 334nm im Eppendorf bestimmt(5cm Küvette).

Berechnung:

$$Ext \cdot 11,33 \cdot 2 \cdot \frac{\ddot{U}}{A} = \mu g \text{ FDP/ml Nativascites}$$

IV.TP-Bestimmung

Reagentien: m/20 TRA-Puffer
NAD-H Lösung(1%ig)
TIM/GDH Kristallsuspension der Fa.Boehringer 1:50 verdünnt

Ausführung:
4ml Ascitesextrakt werden mit 3,7ml TRA-Puffer und 0,1ml NAD-H Lösung vermischt.Gestartet wird mit 0,2ml TIM/GDH-Suspension.Der Extinktionsrückgang wird im Eppendorf bei 366nm gemessen(5cm Küvette).

Berechnung:

$$-Ext \cdot 10,30 \cdot 2 \cdot \frac{\ddot{U}}{A} = \mu g \text{ TP/ml Nativascites}$$

(-Ext = Extinktionsrückgang)

B) Quantitative colorimetrische Bestimmungen

I. NS-und NA-Bestimmung

Reagentien: BrCN-Lösung,frisch angesetzt(10%ig)
1m $KH_2PO_4$-Lösung
Barbitursäure (1%ig)

Prinzip der Methode:(5,6)

Zunächst wird BrCN an den Stickstoff des Pyridingerüstes von NA und NS angelagert.Die zweite Phase der Farbstoffbildung erfolgt in einer Umsetzung des Additionsproduktes mit Aminen,etwa mit Anilin.Wir verwenden Barbitursäure.-Da die Farbintensitäten stark pH-abhängig sind,muß auf ein konstantes Milieu geachtet werden.

Ausführung:
3ml Ascitesextrakt werden mit 1ml BrCN und 1ml $KH_2PO_4$ vermischt.Dann wird 5 Minuten lang im Wasserbad bei 85° C erhitzt.Nach Zugabe von 1ml Barbitursäure nochmaliges Erhitzen 8 Minuten lang auf 85° C.Sofort nach dem Abkühlen werden die Extinktionsdifferenzen gegenüber einem Ringernullwert,der dieselbe Behandlung erfuhr,ermittelt.Die Wellenlängen sind für die NS-Bestimmung 330nm,für NA 410nm(13).

Bei der NS-und NA-Bestimmung werden nicht die Wellenlängen der Extinktionsmaxima verwendet,da sich,wie die Abb. 1 zeigt,die Extinktionskurven überschneiden.Man wählte für die quantitative Bestimmung Wellenlängen,bei denen eine Überschneidung der Extinktionskurven zum größten Teil wegfällt.Bei 410nm zeigt NS keine Extinktion. Jedoch wird bei dieser Wellenlänge das NAD miterfaßt.Da wir immer

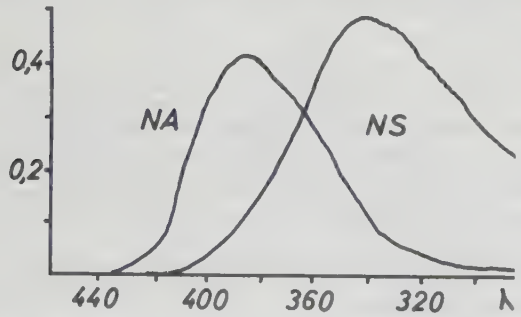



Abb.1: NA und NS zeigen nach der Behandlung mit der BrCN-Methode Extinktionsmaxima bei verschiedenen Wellenlängen.
Ordinate:Extinktionsdifferenz zum Nullwert.
Abszisse:Wellenlänge des Lichtes.

den NAD-Gehalt nach der enzymatisch-optischen Methode mitbestimmen, können wir nach dem Anlegen einer entsprechenden Eichkurve eine Reinigung der Extinktion bei 410nm von der NAD-Komponente vornehmen. Die Restextinktion bei 410nm entspricht dem NA-Gehalt.Jetzt kann auch die Extinktion bei 330nm von der NA-Komponente gereinigt werden; die Restextinktion entspricht dem NS-Gehalt.

Berechnung:(nach erfolgter Reinigung)

NA (410nm):

$$\frac{Ext \cdot 19,69 \cdot Ü}{A} = \mu g \text{ NA/ml Nativascites}$$

NS (330nm):

$$\frac{Ext \cdot 22,19 \cdot Ü}{A} = \mu g \text{ NS/ml Nativascites}$$

II.Bestimmung der Gesamtpyridinnukleotide

Reagentien: 1m KCN-Lösung

Mit dieser Methode werden NAD,TPN,NAM,NR und die nicotinsäureanalogen verbindungen erfaßt (7,8).

Ausführung:
0,5ml Ascitesextrakt werden bei Raumtemperatur mit 2,5ml KCN-Lösung vermischt.Man bestimmt nach 3 Minuten bei 325nm die Extinktionsdifferenz zum Nullwert.(0,5ml Ringer-Perchlorsäure-Lösung (Volumenverhältnis 2:1,pH 6,5) werden mit 2,5ml KCN-Lösung gemischt.) Bei der Messung wurde ein Satz Quarzküvetten verwendet.

Wir berechnen den GPN-Gehalt mit dem Extinktionskoeffizienten des NAD.Eigentlich haben nur Prozentangaben einen Sinn,da unbekannt ist, ob die anderen Komponenten der Gesamtpyridinnukleotide denselben Extinktionskoeffizienten haben.Man kann auf diese Weise jedoch leichter bestimmen,wie sich die Metabolite,separiert vom NAD-Gehalt, quantitativ verhalten,wenn man mit dem Peroxyd behandelt.

Berechnung:

$$Ext \cdot 740 \cdot \frac{U}{A} = \mu g \text{ 'GPN'/ml Nativascites}$$

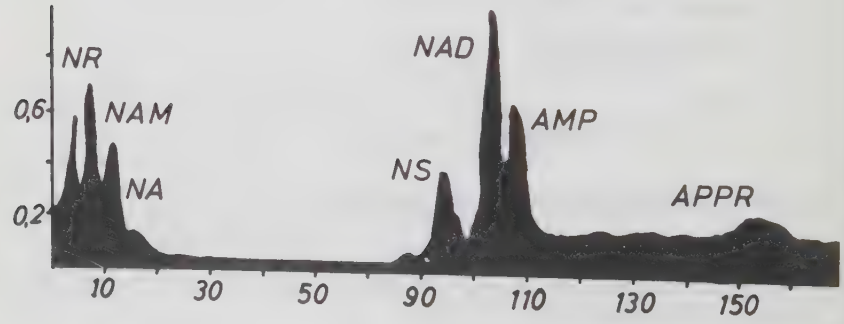
C) Säulenchromatographische Bestimmung von NAD,NR,NAM,NA,AMP,NS,APPR.

Säulendurchmesser:1cm.Säulenhöhe:15cm.Austauscher:DOWEX 1× 2,200-400 mesh,Formiatform.Die Präparation erfolgte nach Busch (9).

Ausführung:
Bis zur 80.Fraktion wird mit Wasser eluiert(Fraktionsvolumen 3-3,5ml). Dabei werden innerhalb der ersten 20 Fraktionen NR,NAM und NA von der Säule gewaschen.Ab der 80. Fraktion erfolgt die von Hurlbert et al. (10) angegebene Gradientenelution mit exponentiell ansteigender Ameisensäurekonzentration.Es werden NS,NAD,AMP und APPR in der genannten Reihenfolge eluiert.Die Extinktionsdifferenzen der einzelnen Fraktionen zu Wasser werden bei 260nm mit dem Spektralphotometer der Fa.Zeiss(Oberkochen) ermittelt.

Wir identifizierten die einzelnen Extinktionsgipfel des Säulenchromatogramms der Abbildung 2 mit den von Holzer(13) angegebenen papierchromatographischen Methoden.

Abb.2: Säulenchromatogramm von Asciteszellextrakt,der von 3ml unbehandeltem Nativascites stammt.
Abszisse: Fraktionsnummer
Ordinate: Extinktionsdifferenz zu Wasser bei 260nm



## 3. Zellvolumenbestimmung

Von verschiedenen Autoren wurden die Zellzahl,der Stickstoffgehalt,das Trockengewicht und das Volumen der Zellen als Bezugspunkte des Metabolitgehaltes gewählt.Wir nehmen als Bezugspunkt das Zellvolumen und ermitteln jeweils den Metabolitgehalt in 1cm$^3$ Zellvolumen.Die Zellvolumenbestimmung entspricht der Hämatokritbestimmung im Blut.Wie im Blut,so stört auch im Ascites das Eiweiß des Ascitesplasmas das Zusammenzentrifugieren der Zellen.Um diese Fehlerquelle gering zu halten,verfahren wir in folgender Weise: Wir pipettieren in Kafkaröhrchen 0,1ml des betreffenden Nativascites. In den Kafkaröhrchen wird der Ascites mit 1ml Ringerlösung verdünnt. Dadurch wird dem Eiweiß des Ascitesplasmas die Möglichkeit gegeben, sich in der Ringerlösung zu verteilen und zu lösen.Die Kafkaröhrchen werden dann in der Stockzentrifuge bei 3000 U/min oder 1512g 15 Minuten lang zentrifugiert.Man kann das Zellvolumen direkt an der Skala der Kapillare des Röhrchens,in die die Zellen sedimentiert werden,nach Eichung ablesen.

Wir müssen an dieser Stelle darauf eingehen,weswegen wir den Metabolitgehalt des Gesamtascites(Plasma und Zellen) auf das Zellvolumen beziehen,da wir nicht wie Holzer vor der Metabolitextraktion die Zellen vom Plasma durch mehrmaliges Waschen trennen.Es zeigte sich bei der Separatbestimmung des Metabolitgehaltes im Plasma und in den Zellen,daß nur die Zellen NAD,ATP,FDP und TP enthalten.Dies gilt auch nach Peroxydbehandlung.Anders verhalten sich NA und NS.Beide Metabolite sind sowohl innerhalb als auch außerhalb der Zellen vorhanden. Wenn man gründlich gewaschene Asciteszellen in eine Krebs-Ringer-Bicarbonat-Glukose-Pufferlösung inkubiert (in der Warburgapparatur bei 37° C und 30 Minuten lang),so erscheinen im Puffer NA und NS. Dieser extrazelluläre Gehalt an NA und NS steigt an,wenn mehr Asciteszellen in 1ml Puffer suspendiert werden.Diese Tatsachen sprechen dafür,auch den NA- und NS-Gehalt im Nativascites auf das Zellvolumen zu beziehen.

## 4. Aufbau der Tierversuche

Allgemeines:
Wenn man bei einer größeren Anzahl von Mäusen den NAD-Gehalt von 1cm$^3$ Krebszellvolumen bestimmt,so streuen die Werte um ±30% um den Mittelwert.Die Streubreite wird kleiner,wenn man die Mäuse mit demselben Mischascites überimpft.Wenn es wie in unseren Versuchen auf die exakte Differenz zwischen der unbehandelten Kontrolle und dem mit Peroxyd behandelten Meßwert ankommt,dann ist es am besten, wenn man von ein und demselben Tier sowohl den Kontrollwert als auch den Meßwert entnimmt.Damit ist die Streubreite der Kontrollwerte kein störender Faktor mehr.- Für diese Methode spricht ein weiterer Vorteil: Die Ascitesextrakte,die von verschiedenen Mäusen gewonnen wurden,hatten bei 330,410 und 325nm differierende optische Dichten.Da bei der colorimetrischen Bestimmung von NA,NS und der Gesamtpyridinnukleotide die Extinktionsdifferenz der Meßproben gegenüber konstanten Nullwerten ermittelt wird,so kann diese Differenz durch die unterschiedliche optische Dichte der Asciteseextrakte verfälscht werden.Diese Fehlerquelle ist deshalb so bedeutend,

weil die Extinktionsdifferenzen bei der NA- bzw. GPN-Bestimmung sehr gering sind.Es zeigte sich nun,daß die optische Dichte von enteiweißten Ascitesportionen,die über die Dauer von 4 Stunden nacheinander einer Maus entnommen wurden,praktisch konstant bleibt.

Praktische Ausführung:
Die Abnahme des Kontroll-und Meßwertes von derselben Maus erfolgt auf folgende Weise:Jeder Maus der einzelnen Versuchsgruppen,die aus 4-6 Mäusen bestehen,wird ohne Narkose 1,5ml Ascites mit einer Spritze abgenommen.(10 Tage alter Ascites eignet sich am besten für diese Methode.)Die Proben jeder Gruppe werden in einem Erlenmeyerkolben,der in einer Kältemischung von -3°C steht,miteinander vermischt.Von diesem Mischascites werden bestimmte Mengen zur Metabolitextraktion und Zellvolumenbestimmung entnommen.Der Metabolitgehalt in 1cm$^3$ Zellvolumen dient als Kontrollwert(=100%).Kurz nach der Entnahme des Kontrollwertes wird in den gegenüber der ersten Einstichstelle gelegenen Bauchhöhlenabschnitt der Maus das Peroxyd, in 0,2ml Ringer gelöst,injiziert.Zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Peroxydapplikation werden die Tiere getötet und je 2ml Ascites aus der nichteröffneten Peritonealhöhle zur Bildung eines Gruppenmischascites entnommen.Dabei wird,wie bei der Kontrolle beschrieben, verfahren.Die Zeit,die von der Tötung der Tiere bis zur Metabolitextraktion mit Perchlorsäure verstreicht,beträgt etwa 2-3 Minuten.

## 5. Isotopenversuche

### A) IsotopenversuchI (Bestimmung der biologischen Halbwertszeit des NAD)

Wir verwendeten 4 Versuchsgruppen.Jede Gruppe bestand aus 2 Mäusen. Die Mäuse wogen 30g,der Ascites war 11 Tage alt.Jede Maus hatte etwa 10ml Ascites.Jedem Tier wurden 3,3µC 14C-U-Glukose i.p.injiziert.Die markierte Glukose war in 0,5ml einer 200mg%igen Glukoselösung enthalten.15,30,60,80 Minuten nach der Glukoseinjektion wurden die jeweiligen Gruppen getötet.Jedem Tier wurden 4ml Ascites entnommen.In vorgekühlten Erlenmeyerkolben wurde der Mischascites der einzelnen Gruppen gebildet.Davon wurden 3ml mit 2ml Ringerlösung verdünnt und dann mit 2,5ml einer 10%igen Perchlorsäurelösung extrahiert.Nach Neutralisation wurde der Überstand mit DOWEX-1-2-Säulen chromatographiert.Die 4 Chromatogramme sind in der Abb.3 dargestellt.Die Fraktionen,die zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des NAD eingesetzt wurden(s.Schluß dieses Abschnittes),sind in der Abbildung mit einem Pfeil kenntlich gemacht.

### B)Isotopenversuch II (zu Abschnitt VI der Ergebnisse)

Der Versuchsaufbau war wie beim Isotopenversuch I.In der einen Serie wurde jedem Tier der 4 Versuchsgruppen 4,5µC 14C-U-Glukose injiziert.Der Ascites wurde 10,22,28,40 Minuten nach der Glukosegabe entnommen.In der anderen parallel angeordneten Serie wurde jedes Tier 5 Minuten vor der Glukoseinjektion mit 1,6mg Bishydroxymethyl-peroxyd vorbehandelt.Die Tiere wurden nach 10,22, 28 und 50 Minuten getötet.Die Chromatogramme sind in der Abb.4 dargestellt.Die Fraktionen,die zur Aktivitätsbestimmung verwendet wurden,sind mit Pfeilen markiert.

Abb.3: Säulenchromatogramme des Isotopenversuches I.
Die Zellextraktion wurde zu verschiedenen Zeiten nach der Injektion der markierten Glukose vorgenommen:
a) nach 15 Min., b) nach 30 Min., c) nach 60 Min. und
d) nach 80 Minuten. Die mit dem Pfeil versehene Fraktion wurde zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des NAD verwendet. Ordinate: Extinktionsdifferenz zu Wasser bei 260nm. Abszisse: Fraktionsnummer.

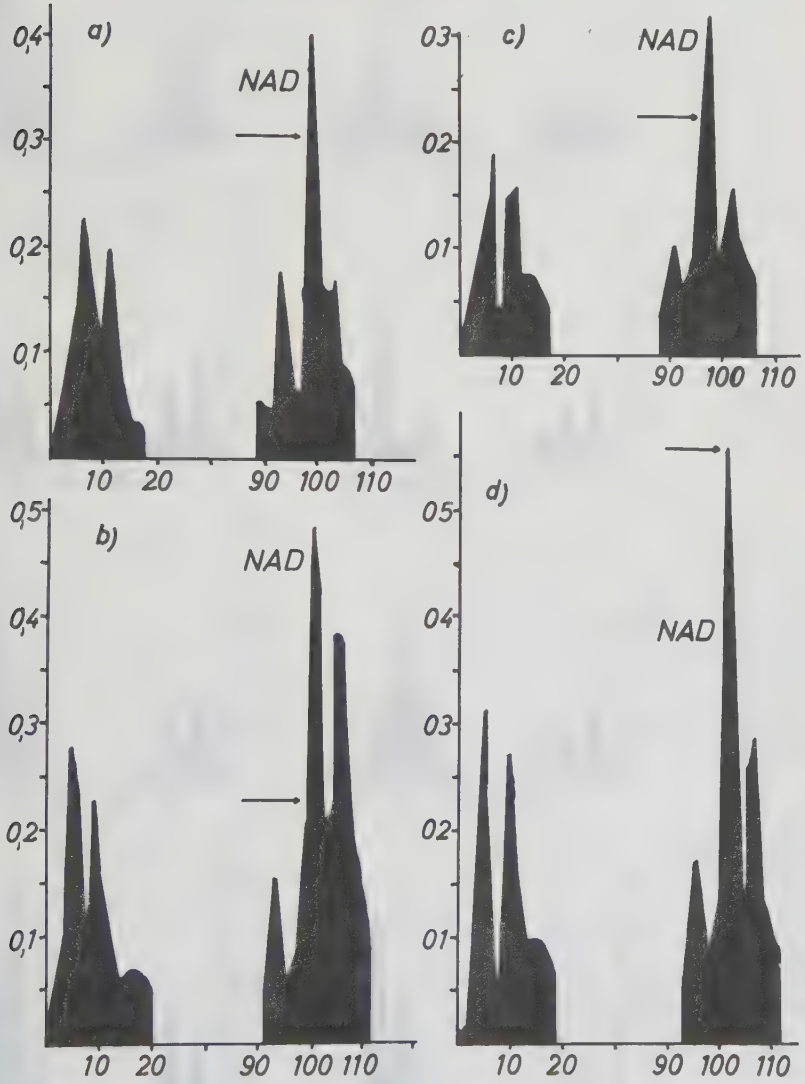
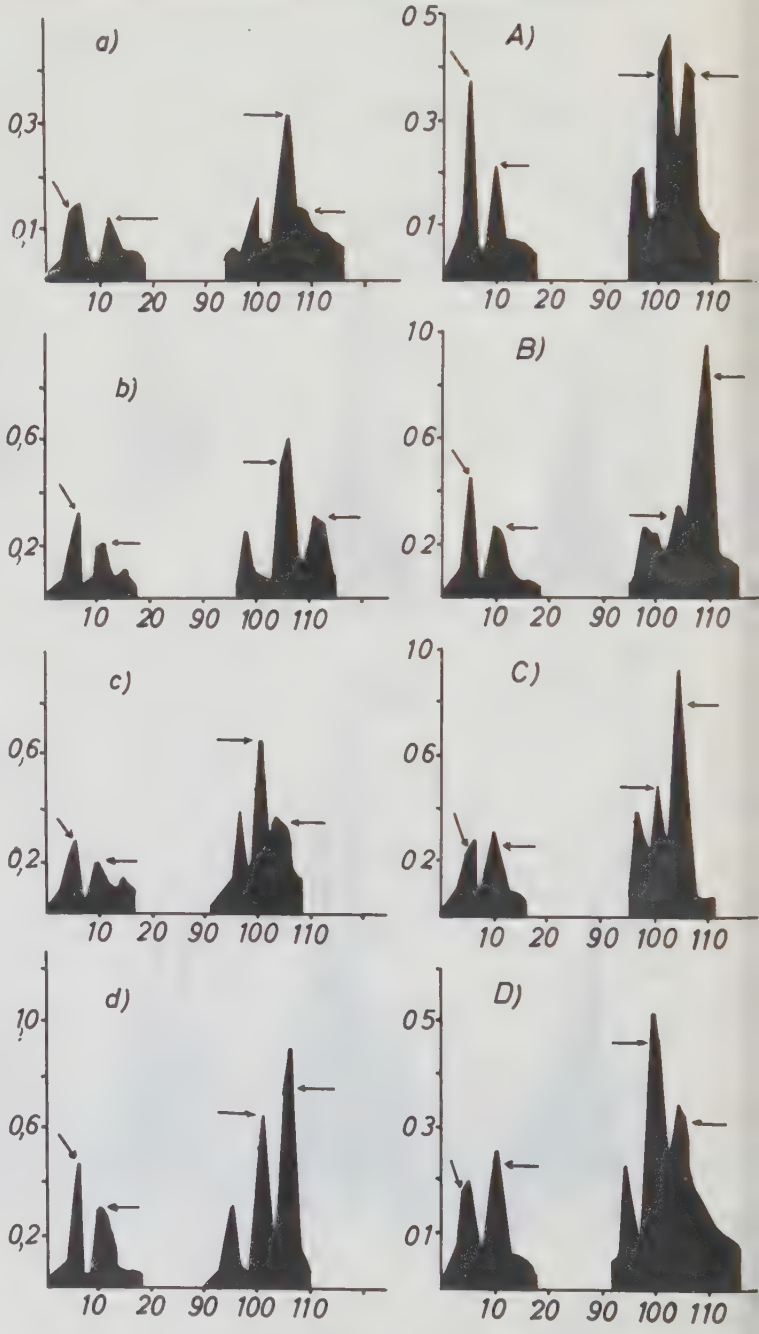


Abbildung 4: Säulenchromatogramme des Isotopenversuches II. Bei der Serie, die mit kleinen Buchstaben bezeichnet ist, wurde nicht mit Peroxyd behandelt, bei der mit großen Buchstaben wurde mit 1,6mg Peroxyd pro Maus behandelt. Die Tiere wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Injektion der markierten Glukose (4,5µC/Maus) getötet und zwar nach
a) 10 Min.,
b) 22 Min.,
c) 28 Min.,
d) 40 Min.,
sowie
A) 10 Min.,
B) 22 Min.,
C) 28 Min.,
D) 50 Minuten.

Die mit Pfeilen versehenen Fraktionen wurden zur Bestimmung der spezifischen Aktivität des entsprechenden Metabolits verwendet.

Ordinate:
Extinktionsdifferenz zu Wasser bei 260nm.

Abszisse:
Fraktionsnummer.



C) Messung der Radioaktivität

0,5ml der mit Pfeilen markierten Fraktionen werden in die verwendete Scintillationsflüssigkeit für wässrige Lösungen spielend leicht aufgenommen.Wir benutzten Ne 220 der Firma Bankhead Medway, Sighthill,Edinburgh 11. 0,5ml Eluat wurden zu 13ml Scintillationsflüssigkeit zugegeben.Mit dem Liquid Counter der Firma Packard wurden die Impulse der Fraktionen 10 Minuten lang ausgezählt.

Durch Eichung ist bekannt,wieviel NAD in 0,5ml Eluat enthalten ist.Somit läßt sich die Impulszahl pro Minute von einem µMol NAD berechnen.Bei NAM,NR und AMP wurden die Impulszahlen auf eine Extinktion von 0,1 bei 260nm(gegenüber Wasser) bezogen,da entsprechende Eichkurven nicht hergestellt werden konnten.

## E R G E B N I S S E

I.

Wir prüften zunächst den Einfluß einer einmaligen Injektion (i.p.) von 1,5mg Bis-hydroxymethyl-peroxyd pro Ascitesmaus auf den Gehalt einer Reihe von Metaboliten im Ascites.Eine Stunde nach der Injektion wurde der Versuch abgebrochen.Die Entnahme des Kontroll- und Meßwertes erfolgte wie in der Methodik beschrieben.In der Tabelle 1 sind die quantitativen Analysenergebnisse zusammengestellt.

Tabelle 1: Einfluß einer einmaligen Injektion von Bishydroxymethyl-peroxyd (1,5mg/Maus) auf den Metabolitgehalt des Ascites.K.= unbehandelter Kontrollwert;M.= Meßwert nach Peroxydbehandlung; ZV = Zellvolumen.

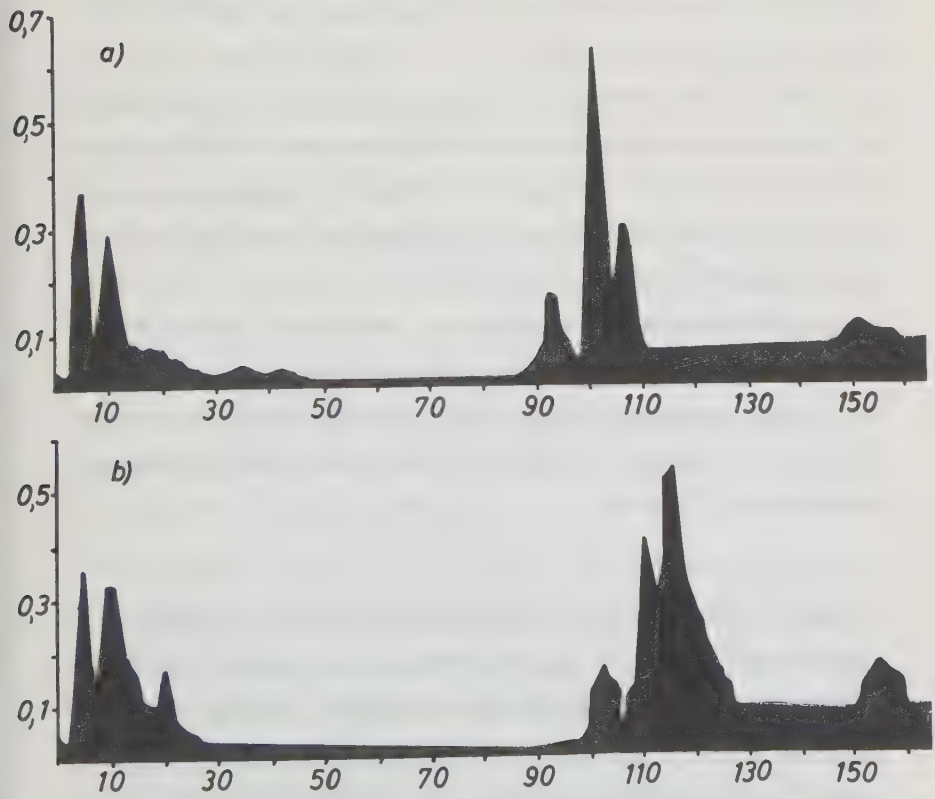
| Metabolit | | µg/cm³ ZV | µMol/cm³ ZV | % |
|---|---|---|---|---|
| ATP | K. | 2204 | 4,35 | 100 |
| | M. | 1581 | 3,12 | 72 |
| NAD | K. | 250 | 0,34 | 100 |
| | M. | 141 | 0,19 | 58 |
| GPN | K. | 380 | | 100 |
| | M. | 275 | | 72 |
| NS | K. | 63 | 0,51 | 100 |
| | M. | 70 | 0,57 | 111 |
| NA | K. | 7 | 0,06 | 100 |
| | M. | 18 | 0,15 | 250 |
| TP | K. | 8 | 0,05 | 100 |
| | M. | 93 | 0,55 | 1196 |
| FDP | K. | 3 | 0,01 | 100 |
| | M. | 650 | 2,01 | 20318 |

Der NAD-und ATP-Gehalt nimmt im Ascites nach der Peroxydinjektion ab,während NA,FDP und TP unterschiedlich stark angestaut werden.Da der Spiegel der Gesamtpyridinnukleotide praktisch nur um die NAD-komponente abnimmt, müssen die anderen Bestandteile der Pyridinnukleotide insgesamt konstant geblieben sein.

Eine Differenzierung dieser allgemeinen Aussage kann durch die quantitativ durchgeführte Säulenchromatographie zur Trennung der Pyridinnukleotide vorgenommen werden.Wir injizierten wie oben 1,5mg Bis-hydroxymethyl-peroxyd i.p. und töteten die Tiere 1 Stunde danach.

In der Abbildung 5 sind die Chromatogramme des Kontroll-und Meßwertes dargestellt.Man kann an Hand der Extinktionswerte (Ordinate) einen direkten Vergleich zwischen den Metabolitkonzentrationen des Kontroll- und Meßwertes ziehen,da sie sich auf dasselbe Zellvolumen beziehen.Wir korrigierten nämlich die Extinktionen des Meßwertes nach den Kafkawerten,so daß sie dem Zellvolumen des Kontrollwertes entsprechen.

Abb.5: Säulenchromatogramme eines behandelten und unbehandelten Ascites.(1,5mg Peroxyd/Maus;siehe Text!) a)unbehandelter Kontrollwert,b)mit Peroxyd behandelter Meßwert.Kontroll- und Meßwert wurden wie in der Methodik beschrieben denselben Mäusen entnommen.



Einige der oben beschriebenen Ergebnisse ließen sich säulenchromatographisch bestätigen. Der NAD-Gehalt der Asciteszelle nimmt eine Stunde nach der Peroxydapplikation stark ab (s. Abb. 5), während die Nicotinamidkonzentration ansteigt. Der Nicotinsäurespiegel der Zelle bleibt konstant. Neu kommt hinzu, daß die Konzentration des freien AMP beträchtlich ansteigt. Außerdem kann man, wie bereits oben angedeutet, den Befund der Gesamtpyridinnukleotide, der colorimetrisch ermittelt wurde, weiter differenzieren. Wie man aus der Abbildung 5 ersieht, ändert sich der Gehalt an NAM und NR nur geringfügig. Dies bedeutet, daß die einzelnen Komponenten der Gesamtpyridinnukleotide, ausgenommen NAD, jede für sich durch die Peroxydbehandlung in ihrer zellulären Konzentration nicht beeinflußt werden. Somit wurde indirekt durch die quantitative Bestimmung von 3 GPN-Komponenten (NAD, NR und NAM) auch die 4., das TPN mitbestimmt, dessen Spiegel unbeeinflußt bleibt. (Die nicotinsäureanalogen Verbindungen des NAD und NAM, die mitbestimmt werden, fallen quantitativ nicht ins Gewicht.)
Es kam zwar in den Fraktionen, in denen APPR eluiert wird, zu einer Extinktionszunahme, jedoch werden hier nach Schmitz et al. (11) auch andere Substanzen eluiert, so daß man nicht entscheiden kann, ob die Konzentration von APPR in der Zelle nach Peroxydbehandlung erhöht wird.

II.

Da somit die Peroxydinjektion eine Reihe von Metabolitkonzentrationen ändert, prüften wir, ob diese Effekte durch einen direkten Angriff des Peroxyds an den Metabolitmolekülen zustande kommen. Holzer et al. (12) diskutierten die Möglichkeit, daß das Tetraminpräparat der Fa. Merck (Darmstadt) das Nicotinamid alkyliert.

Wir untersuchten sowohl bei neutralem als auch bei saurem pH-Wert, ob sich die Wellenlänge des Extinktionsmaximums einer wässerigen Lösung von NAD,NA und NS verschiebt,oder ob die Extinktionsamplitude geändert wird,wenn man Peroxyd der Lösung hinzufügt.Es tritt nach der Peroxydapplikation keinerlei Veränderung auf.Zu demselben Ergebnis kommt man,wenn man den Gehalt einer Peroxydlösung an aktivem Sauerstoff vor und nach Zugabe von NA,NAD und NS bestimmt.(15) Der Persauerstoffgehalt der Lösung ändert sich nicht.
Somit ist bewiesen,daß das Bis-hydroxymethyl-peroxyd indirekt durch Eingriff in den intrazellulären Stoffwechsel den Gehalt an NAD und NA ändert.

III.

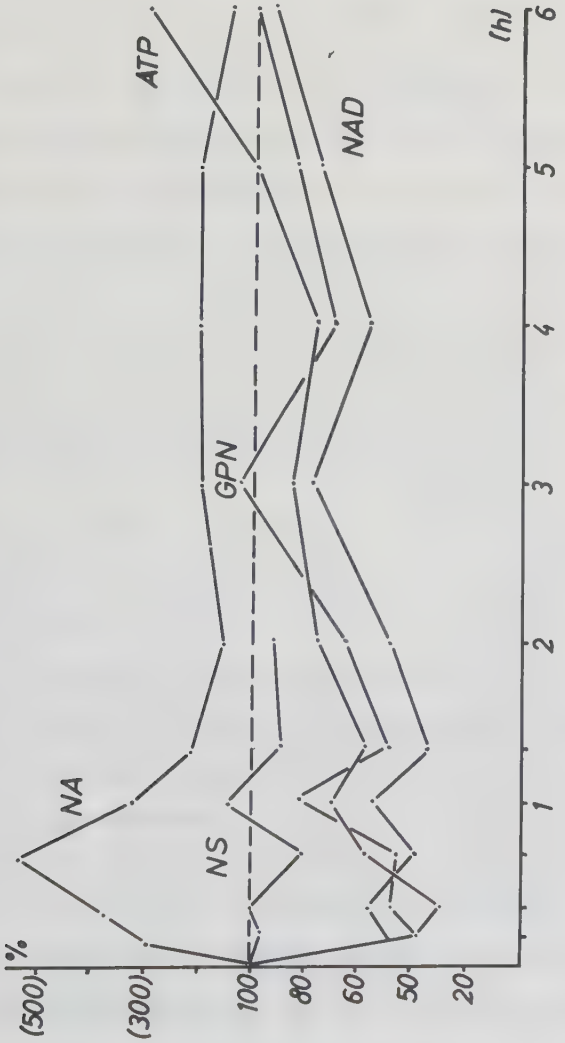
Wir stellten uns die Frage,ob die Konzentrationsänderungen der Metabolite irreversibel sind,oder ob die Asciteszelle unter in-vivo-Bedingungen die Fähigkeit besitzt,die durch das Peroxyd verursachten Schäden im Laufe der Zeit wieder zu beheben.
Wir bestimmten deshalb den Metabolitgehalt 10,20,40,60,80 Minuten sowie 2,3,4,5,6 Stunden nach der Peroxydinjektion (1,5mg/Maus).
In der Tabelle 2 sind die Ergebnisse der quantitativen Metabolitanalysen zusammengefaßt.In der Abbildung 6 sind die einzelnen Meßwerte in Prozenten ihrer Kontrollen(=100%) in Abhängigkeit von der Einwirkdauer des Peroxyds in einem Koordinatensystem dargestellt.

Der NA-,NAD-,ATP-und GPN-Spiegel und,wie die Säulenchromatographie zeigte,auch der AMP-Spiegel sind 6 Stunden nach der Peroxydinjektion wieder auf das Ausgangsniveau vor der Peroxydbehandlung einreguliert.Dagegen bleiben die FDP- und TP-Konzentrationen noch 6 Stunden nach der Injektion über dem Spiegel der Kontrollen,sind aber zu diesem Zeitpunkt bereits bedeutend gegenüber dem anfänglichen Anstau zurückgegangen.(Im nächsten Kapitel wird dieser letztere Befund gesondert behandelt.)

Tabelle 2: Zusammenstellung der Ergebnisse der quantitativen Metabolitbestimmung nach unterschiedlich langer Peroxydeinwirkung auf Asciteszellen in vivo. Der Metabolitgehalt von 1cm³ Zellvolumen ist in µg bzw. in Klammern in µMol angegeben.
K. = unbehandelte Kontrolle
M. = Meßwert nach Peroxydapplikation

| Metabolit | Zeit nach der Peroxydgabe | 10m. | 20m. | 40m. | 60m. | 80m. | 2 h. | 3 h. | 4 h. | 5 h. | 6 h. |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ATP | K. | 1476 | 1523 | 1474 | 2204 | 1996 | 1869 | 1928 | 1938 | 1620 | 1349 |
| | | (2,91 | 3,00 | 2,91 | 4,25 | 3,94 | 3,62 | 3,80 | 3,82 | 3,19 | 2,66) |
| | M. | 569 | 446 | 867 | 1581 | 1100 | 1444 | 1675 | 1447 | 1619 | 1891 |
| | | (1,12 | 0,88 | 1,70 | 3,12 | 2,17 | 2,85 | 3,30 | 2,85 | 3,19 | 3,73) |
| NAD | K. | 219 | 229 | 249 | 242 | 249 | 238 | 243 | 254 | 203 | 191 |
| | | (0,30 | 0,33 | 0,34 | 0,33 | 0,34 | 0,32 | 0,33 | 0,35 | 0,28 | 0,26) |
| | M. | 110 | 132 | 99 | 136 | 90 | 118 | 195 | 145 | 155 | 177 |
| | | (0,15 | 0,18 | 0,13 | 0,19 | 0,12 | 0,16 | 0,27 | 0,20 | 0,21 | 0,24) |
| GPN | K. | 333 | 319 | 374 | 355 | 480 | 380 | 387 | 376 | 335 | 319 |
| | M. | 131 | 158 | 175 | 300 | 239 | 256 | 415 | 264 | 283 | 317 |
| FDP | K. | 3,65 | 3,35 | 2,76 | 3,03 | 5,25 | 4,47 | 3,60 | 3,21 | 2,29 | 1,98 |
| | | (0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,02 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01 | 0,01) |
| | M. | 1211 | 1967 | 1585 | 623 | 1415 | 620 | 488 | 888 | 218 | 285 |
| | | (3,74 | 6,07 | 4,89 | 1,92 | 4,36 | 1,91 | 1,51 | 2,74 | 0,67 | 0,88) |
| TP | K. | 5,91 | 6,86 | 10,0 | 15,0 | 48,6 | 7,32 | 13,1 | 2,50 | 2,97 | 9,00 |
| | | (0,02 | 0,04 | 0,06 | 0,09 | 0,29 | 0,04 | 0,08 | 0,02 | 0,02 | 0,05) |
| | M. | 208 | 309 | 213 | 87 | 208 | 97 | 97 | 129 | 50 | 91 |
| | | (1,22 | 1,82 | 1,25 | 0,51 | 1,22 | 0,57 | 0,57 | 0,76 | 0,29 | 0,54) |
| NA | K. | 7,76 | 6,92 | 3,00 | 5,27 | 9,13 | 9,33 | 6,61 | 7,58 | 6,32 | 7,92 |
| | | (0,06 | 0,06 | 0,02 | 0,04 | 0,07 | 0,07 | 0,05 | 0,06 | 0,05 | 0,06) |
| | M. | 23,7 | 26,5 | 16,2 | 17,4 | 20,1 | 15,2 | 13,3 | 15,1 | 12,8 | 11,1 |
| | | (0,19 | 0,22 | 0,13 | 0,14 | 0,16 | 0,12 | 0,11 | 0,12 | 0,10 | 0,09) |
| NS | K. | 68,0 | 66,3 | 68,8 | 59,7 | 73,8 | 75,8 | | | | |
| | | (0,55 | 0,54 | 0,56 | 0,49 | 0,60 | 0,62) | | | | |
| | M. | 66,6 | 67,6 | 57,0 | 66,7 | 67,1 | 71,0 | | | | |
| | | (0,54 | 0,55 | 0,46 | 0,54 | 0,55 | 0,58) | | | | |

Abb.6: Die Abbildung zeigt die Abhängigkeit der Änderungen der Metabolitkonzentrationen von der Zeit nach der Peroxydapplikation. Ordinate:Meßwerte in % der Kontrollwerte(=100%).Die Prozenteinteilung der Ordinate in Klammern gilt nur für NA. Abszisse: Zeit(in Stunden) nach der Peroxydinjektion(1,5mg/Maus).



IV.

Die bisherigen Versuche geben Aufschluß, ob und in welchem Masse sich die Metabolitkonzentrationen ändern, wenn man Ascites mit Peroxyd behandelt. Unter den Metabolitänderungen waren nun diejenigen herauszufinden, welche unmittelbar auf die Peroxydeinwirkung zurückzuführen sind, um sie von denen zu trennen, die erst als Folge dieser Primäreffekte geändert werden. Wir ließen daher 2,4mg Bis-hydroxymethyl-peroxyd in vitro 5 bzw. 10 Minuten auf 12ml Nativascites einwirken und untersuchten, welche Metabolitkonzentration zuerst geändert wird. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3: Nr.1 dient als Kontrollwert; wir gaben zu 12ml Nativascites 0,4ml Ringer. Bei Nr.2 behandelten wir mit Peroxyd; Zu 12ml Ascites wurden 2,4mg Peroxyd, in 0,4ml Ringer gelöst, hinzugegeben. Die Werte der Tabelle sind in µg/cm³ Zellvolumen bzw. in Klammern in µMol angegeben. Bei den Prozentangaben wurde auf den 0-Minuten-Wert Bezug genommen.

| | Zeit nach Ringer-bzw. Peroxydapplikation | ATP µg-µMol | % | NAD µg-µMol | % | NA µg-µMol | % | NS µg-µMol | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nr.1 | 0 min. | 333,4 (0,631 | 100 | 107,5 0,146 | 100 | 3,330 0,027 | 100 | 28,20 0,229) | 100 |
| | 5 min. | 376,7 (0,698 | 112 | 105,0 0,143 | 98 | 3,740 0,031 | 112 | 25,50 0,207) | 91 |
| | 10 min. | 342,9 (0,636 | 103 | 102,6 0,140 | 96 | 3,740 0,031 | 112 | 24,33 0,198) | 86 |
| Nr.2 | 0 min. | 278,7 (0,550 | 100 | 99,38 0,135 | 100 | 1,860 0,015 | 100 | 19,93 0,162) | 100 |
| | 5 min. | 278,7 (0,550 | 100 | 77,43 0,105 | 78 | 4,122 0,034 | 221 | 17,09 0,139) | 86 |
| | 10 min. | 249,4 (0,492 | 90 | 50,79 0,069 | 51 | 10,50 0,086 | 564 | 21,07 0,171) | 106 |

Wie aus der Tabelle 3 ersichtlich, wird der NAD- und NA-Gehalt der Zelle bereits 5 Minuten nach der Peroxydapplikation deutlich ver-

ändert.Die ATP-Konzentration nimmt erst nach 10 Minuten ab. Wie Hilz(17) bereits schon beschrieben hat,sinkt der NAD-Gehalt bereits nach 10 Minuten auf die Hälfte des ursprünglichen Wertes ab. --

Durch die Applikation von NA (15mg/Maus) gelingt es,den NAD-Gehalt der Asciteszelle trotz Peroxydbehandlung auf dem ursprünglichen Niveau zu halten.Wir untersuchten,ob dennoch Anderungen einzelner Metabolitkonzentrationen festzustellen sind.Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4 zusammengestellt.

Tabelle 4: Die Angaben der Tabelle beschränken sich auf die prozentualen Änderungen des Metabolitgehaltes nach Peroxyd-,NA- und NAD-Behandlung gegenüber dem Kontrollwert(100%).Der Kontrollwert wurde vor der Applikation der jeweiligen Stoffe den Mäusen entnommen.NA und NAD wurden in 0,5ml Ringer gelöst,5 Minuten vor der Peroxydgabe i.p. injiziert.Das Peroxyd wirkte eine Stunde.

| Applikation pro Maus | ATP | NAD | FDP | TP |
|---|---|---|---|---|
| 1,5mg Peroxyd | 77% | 78% | 19800% | 1781% |
| 1,5mg Per. + 10mg NA | 103% | 97% | 2145% | 553% |
| 1,5mg Per. +20mg NAD | 81% | -- | 18797% | 2647% |

Wie die Tabelle 4 zeigt,bleibt bei Vorbehandlung mit NA neben dem NAD-Spiegel auch der von ATP konstant,wenn man das Peroxyd injiziert.Es kommt jedoch zum Anstau von FDP und TP.Wie die entsprechenden Vergleichswerte mit Peroxydbehandlung allein zeigen,ist jedoch die Konzentrationserhöhung lange nicht so groß, wenn man mit NA vorbehandelte.Sie liegt beim TP bei etwa 30% des Vergleichswertes,beim FDP bei etwa 10%.Eine Praeinkubation mit NAD hat keinerlei Einfluß auf die Peroxydwirkung.Die Metabolitkonzentrationen ändern sich quantitativ genauso,als ob das Peroxyd allein injiziert worden wäre.

V.

Alle diese Befunde zeigen,daß der NAD-Gehalt primär durch das Bis-hydroxymethyl-peroxyd beeinflußt wird.Wie kommt diese NAD-Depression zustande? - Zunächst untersuchten wir,ob die Annahme einer Syntheseblockung des NAD nicht im Widerspruch zu dem sehr raschen Absinken des NAD-Gehaltes steht.(Innerhalb von 10 Minuten auf 50% des Ausgangswertes!) Hilz postuliert (17,24), daß nur ein verstärkter Abbau des NAD diesen rapiden Abfall erklären kann.Er nimmt bei dieser Forderung auf die von Holzer (14) angegebene Halbwertszeit des NAD von 30-45 Minuten Bezug.Dieser Wert wurde jedoch unter in-vitro-Verhältnissen ermittelt.Wir bestimmten deshalb die biologische Halbwertszeit des NAD in vivo. Der Versuchsaufbau wurde bereits in der Methodik genau beschrieben(Isotopenversuch I).

Die Abbildung 7 zeigt die Abhängigkeit der Radioaktivität im NAD von der Zeit nach der Verabfolgung der durchmarkierten (14C) Glukose.(3,3µC/Maus.)

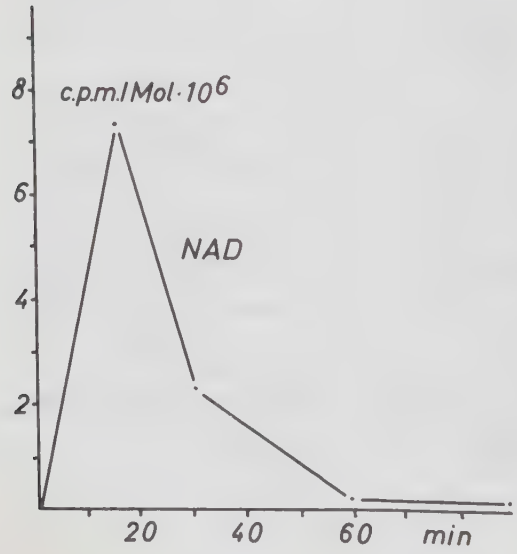



Abb.7: Die spez. Aktivität von NAD, in Abhängigkeit von der Zeit nach der Injektion der markierten Glukose,ist in der Abbildung als Ordinatengröße eingetragen. (Siehe Methodik, Isotopenversuch I !)

Da einerseits die Glukosekonzentration im Ascitesplasma nach Warburg(18) gering ist, und wir andererseits

bei der Applikation der radioaktiven Glukose nur eine sehr kleine Glukosemenge injizierten,können wir annehmen,daß bereits nach der frühesten Abnahmezeit des Ascites(15 Minuten nach der Glukoseinjektion) die radioaktive Glukose aus dem Ascitesplasma verschwunden ist.Wir untersuchten in diesem Zusammenhang die Aufnahme von Glukose durch Asciteskrebszellen im Warburgapparat unter anaeroben Bedingungen.(Stickstoffbegasung der Zellen.)Innerhalb von 90 Minuten wurden von $1cm^3$ Zellvolumen etwa 50mg Glukose verbraucht.Dieser Befund bestätigt obige Annahme.Das Entscheidende für die Bestimmung der biologischen Halbwertszeit ist,daß unter den eben geschilderten Umständen der Nachschub von radioaktivem Material in kurzer Zeit versiegt.Auf diese Weise wird das Absinken der spezifischen Aktivität des NAD nach dem Inkorporierungsmaximum nicht verzögert.Man kann somit die Zeit vom Maximum der spezifischen Aktivität bis zum Absinken auf 50% dieses Wertes als die biologische Halbwertszeit des NAD bezeichnen,in der die Hälfte des NAD durch Neusynthese ersetzt wird.

Aus der Abbildung 7 kann man ersehen,daß die Halbwertszeit des NAD in vivo ungefähr 10 Minuten beträgt.(Das Ergebnis wurde durch Wiederholung bestätigt.)

Von der Seite der biologischen Halbwertszeit des NAD steht also der Annahme,daß das Peroxyd die Synthese des NAD hemmt,nichts entgegen.

VI.

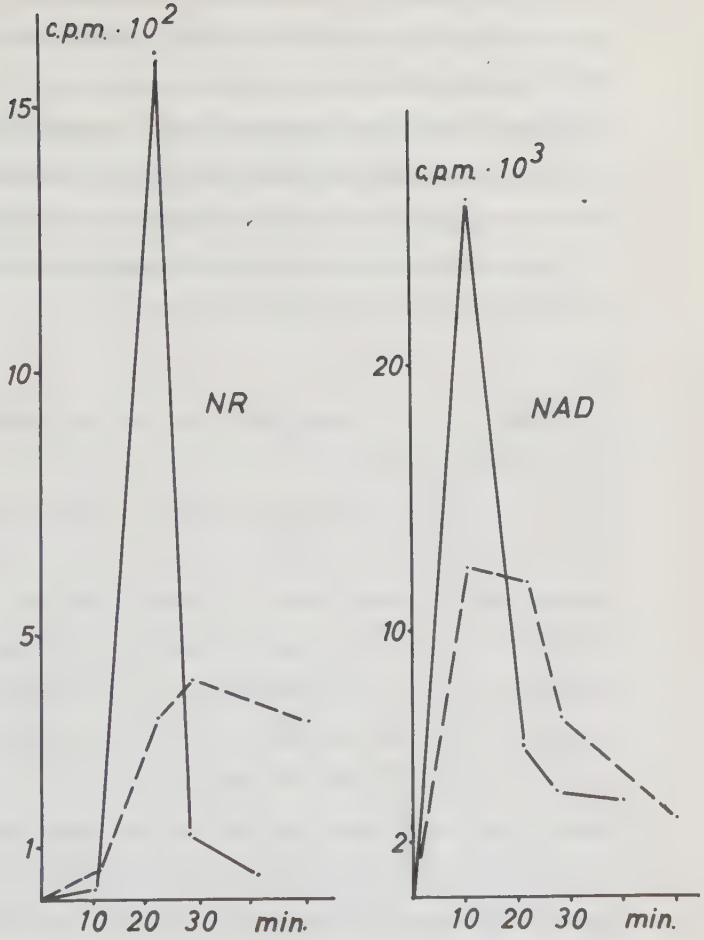
Um zu erfahren,ob das Peroxyd die NAD-Synthese blockiert,wurde untersucht,wie sich der Einbau von Radioaktivität in NAD ändert, wenn man einmal den Ascites nicht behandelt,das andere Mal Peroxyd injiziert.Dieselben Vergleiche wurden auch bei AMP,NAM und NR vorgenommen.Der genaue Versuchsaufbau wurde bereits in der Methodik beschrieben.(Isotopenversuch II.)

Die Abbildungen 8 und 9 zeigen die Unterschiede der spezifischen Aktivitäten von NAD,NR,AMP,NAM ohne und nach Peroxydbehandlung. Wie aus der Abb.8 ersichtlich ist,ähnelt der Kurvenverlauf der spezifischen Aktivität des NAD dem von NR.Die spezifische Aktivität wird bei beiden durch das Peroxyd auf die Hälfte des unbehandelten Kontrollwertes reduziert.Außerdem verschwindet die Radioaktivität aus beiden Metaboliten langsamer,wenn mit Peroxyd behandelt wurde.In einem wesentlichen Punkt unterscheiden sich jedoch die beiden Metabolite voneinander:Die Inkorporierung der Radioaktivität erfolgt bei NR erst 5 Minuten später als bei NAD. Man muß deshalb NR,wenn es im NAD-Stoffwechsel eine Funktion ausübt,als ein Abbauprodukt des NAD ansehen.
Die beiden charakteristischen Veränderungen,die nach der Peroxydbehandlung auftraten,nämlich die Verringerung der spezifischen Aktivität des NAD und ihr verzögerter Abfall,weisen daraufhin,daß die NAD-Synthese durch Bis-hydroxymethyl-peroxyd blockiert wird.

Nach dem Maximum nimmt die spezifische Aktivität des NAD in unbehandelten Zellen schnell ab,da die aktiven Moleküle einerseits durch die Neusynthese aus nun wieder inaktiven Vorstufen verdünnt und andererseits durch den eigenen stetigen Abbau entfernt werden. Die eben geschilderte Verdünnung der aktiven Moleküle durch neusynthetisierte inaktive erfolgt wegen der Blockierung ihrer Synthese nach Peroxydbehandlung weniger rasch.Als Folge sehen wir den verzögerten Abfall der Radioaktivität nach Peroxydbehandlung.

Wie man aus der Abb.9 ersehen kann,steigt die spezifische Aktivität des freien AMP im Verlaufe von 50 Minuten sowohl beim Kontrollwert,als auch nach Behandlung langsam an.Der etwas steilere Anstieg beim Kontrollwert mag damit zusammenhängen,daß ein Teil des mar-

Abbildung 8




Text zu den Abbildungen 8 und 9:

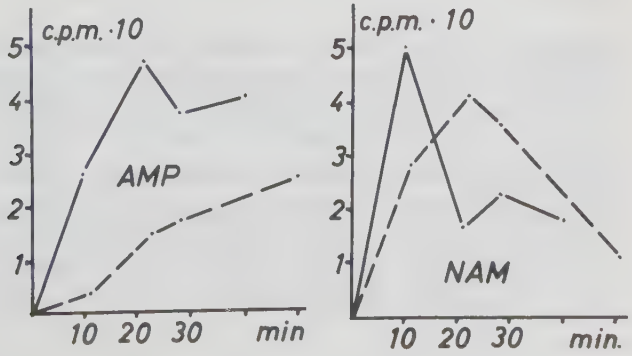
Spezifische Aktivität von NAD, NR, AMP und NAM in Abhängigkeit von der Zeit nach der Injektion der radioaktiven Glukose ($^{14}$C-U-Glukose einer Aktivität von 4,5µC/Maus). Näheres unter Isotopenversuch II in der Methodik !

_____ ohne Peroxydbehandlung
------ nach Peroxydbehandlung (1,6mg/Maus)

Ordinate: Impulszahl pro Minute (c.p.m.) bezogen auf eine Extinktion von 0,1 bei 260nm gegenüber Wasser.

Abszisse: Zeit nach der Injektion der radioaktiven Glukose.

Abbildung 9



kierten freien AMP aus dem NAD-Molekül stammt,wobei die höhere spezifische Aktivität des NAD in nicht behandelten Zellen auf AMP übertragen wird.

NAM kann allein schon wegen des zeitlichen Verlaufes der Inkorporierung radioaktiven Materials kein Zwischenprodukt der NAD-Synthese sein.Zeitlich liegt das Maximum der spezifischen Aktivität wie beim NAD.Die Impulszahlen,die gemessen wurden,liegen um 3 Zehnerpotenzen niedriger als beim NAD.

VII.

Im Abschnitt IV wurde ausgeführt,daß durch das Peroxyd die Konzentrationen von NAD und NA in der Asciteszelle bereits 5 Minuten nach der Applikation geändert werden.Es besteht die Möglichkeit, daß das Peroxyd im NAD-Stoffwechsel nur an einer einzigen Stelle angreift,und als Folge davon gleichzeitig der NAD- und NA-Gehalt geändert werden.Wir untersuchten daher,ob ein quantitativer Zusammenhang zwischen dem NAD-Abfall und dem NA-Anstau besteht. Es zeigte sich in der Tat,daß ebensoviel NA-Moleküle angestaut werden,wie es der Abnahme des NAD-Gehaltes nach Peroxydgabe entspricht.Dies gilt jedoch nur,wie Tabelle 5 zeigt,für eine Behandlungsdauer,die kürzer als eine Stunde ist.Über diese Zeit hinaus differieren die Werte,bleiben jedoch in derselben Größenordnung.

Tabelle 5: Anstau von NA gegenüber dem jeweiligen Kontrollwert(µMol/cm$^3$ Zellvolumen)und Abfall von NAD gegenüber der Kontrolle(-µMol/cm$^3$ Zellvolumen)nach kurzzeitiger Einwirkung von 1,5mg Bis-hydroxymethyl-peroxyd pro Maus.

| Zeit nach Peroxydgabe | 5 min. | 10 min. | 20 min. | 40 min. | 60 min. |
|---|---|---|---|---|---|
| NA | 0,02 | 0,13 | 0,16 | 0,11 | 0,10 |
| NAD | -0,03 | -0,15 | -0,15 | -0,20 | -0,14 |

Bei der Differenzierung dieses Befundes zeigte sich,daß bei der Peroxydbehandlung sowohl die intrazelluläre als auch die extrazelluläre NA-Konzentration ansteigt.Es wurde der NA-Gehalt sowohl im Ascitesplasma als auch in den gewaschenen Zellen bestimmt.Das oben geschilderte stöchiometrische Verhalten des NAD-Abfalls und NA-Anstaus besteht nur,wenn man den Gesamtanstieg von Nicotinamid in beiden Räumen zum Vergleich heranzieht.

Diskussion

Das Bishydroxymethyl-peroxyd hinterläßt in den Asciteszellen (1,5mg/Maus i.p.) keine permanenten Schäden,sofern man aus den Konzentrationen der untersuchten Metabolite Rückschlüsse auf die Gesamtzelle ziehen darf.Die Konzentrationen folgender Metabolite hatten bereits 6 Stunden nach der Peroxydapplikation das Ausgangsniveau erreicht:NAD,NA,ATP,GPN und AMP.Der Gehalt an FDP und TP normalisierte sich erst nach 8-10 Stunden.Diese nur befristeten Konzentrationsänderungen scheinen jedoch mit der therapeutischen Wirkung des Peroxyds zusammenzuhängen.Denn Peroxyde,die keine cytostatische Wirkung besitzen,wie z.B. Bis-(tert.-butylperoxymethyl)-piperazin(15),ändern den intrazellulären Spiegel der untersuchten Metabolite nicht.Noch ein anderer Befund spricht dafür,daß die Zellen nach einmaliger Peroxydinjektion nur kurzfristig geschädigt werden: Wenn man Asciteszellen,die in vivo mit dem Peroxyd behandelt wurden, anderen Mäusen überimpft,so wächst der Ascites von Anfang an ebenso rasch weiter wie bei den unbehandelten Kontrollen.

Von besonderem Interesse ist die Frage nach den primären Angriffspunkten des Peroxyds im Stoffwechsel der untersuchten Metabolite. Eine genaue Analyse zeigte(s.o.),daß der Gehalt der Asciteszelle an NAD und NA unmittelbar durch das Peroxyd beeinflußt wird.Die ATP- und GPN-Konzentrationen dagegen werden erst sekundär als Folge dieser primären Angriffspunkte geändert.So nehmen die Gesamtpyridinnukleotide nur um die NAD Komponente ab.Ferner bleibt nach der Vorbehandlung mit NA außer dem NAD-Gehalt auch derjenige an ATP trotz Peroxydapplikation unbeeinflußt.Zudem sinkt der ATP-Gehalt später

als der NAD-Gehalt,die ATP-Abnahme erfolgt dann jedoch mit derselben Schnelligkeit wie beim NAD,d.h.innerhalb von 10 Minuten auf die Hälfte des Ausgangswertes.Da sich gleichzeitig das freie AMP in der Zelle anhäuft,ist anzunehmen,daß das bindende Glied zwischen NAD und ATP eine Phosphorylierungsreaktion ist,die durch den Abfall des NAD limitiert wird.Ob dafür die GAPDH-Reaktion allein in Frage kommt,ist noch unklar.Die Phosphorylierung von ADP bzw.AMP kann dann auf Grund des NAD-Mangels nur noch in ungenügender Form durchgeführt werden,sodaß es zum ATP-Abfall und dementsprechend zum Anstieg an freiem AMP in der Zelle kommt.Aus den Isotopenversuchen geht hervor(s.o.Abschnitt VI),daß der NAD-Abfall nach Peroxydbehandlung durch die Blockierung der NAD-Synthese zustande kommt.Das Bis-hydroxymethyl-peroxyd wirkt also wie Azaserin (20,22) und Tetramin(14) hemmend auf die NAD-Synthese.Da nun nach Peroxydinjektion die Zunahme an NA und die Abnahme an NAD sich stöchiometrisch wie 1:1 verhalten,ist anzunehmen,daß die Synthesehemmung durch das Peroxyd auf einer Blockierung des Einbaus von NA in NAD-Vorstufen beruht. Man kann auf diese Weise gut erklären,warum die Vorbehandlung mit hohen NA-Dosen den Abfall des NAD verhindert,indem nämlich die hohe NA-Konzentration die Blockierung des NA-Einbaus rein quantitativ aufheben kann,obwohl der Hemmeffekt des Cytostaticums nach wie vor besteht(s.b.Holzer(19)).

Die Rolle des NA bei der NAD-Synthese ist zur Zeit ein sehr aktuelles Thema.Arbeiten von Preiss und Handler (20,21),Narrod und Kaplan(22), Kaplan et al.(23) beschäftigen sich mit diesem Problemkreis. Während in menschlichen Erythrozyten nur die Nicotinsäure für die NAD-Synthese verwendet werden kann(20),wird NA in das NAD der Maus-

und Rattenleber und der Asciteszellen in vivo eingebaut.Wie dieser Einbau genau erfolgt ist noch unbekannt.Wahrscheinlich wird NA desaminiert und erscheint schließlich als NS im Desamino-NAM(22). Der weitere Syntheseweg führt über Desamino-NAD und einer nachfolgenden Aminierungsreaktion (22) zum NAD.Man spricht hier vom sog. 'Preiss-Handler Weg' der NAD-Synthese,da dieser Weg von Preiss und Handler(20,21) unter in-vitro-Bedingungen an Erythrozytenextrakten und Hefehomogenaten aufgefunden wurde.Er ließ sich in vivo bestätigen(20-22).Auf Grund dieser Befunde ist der Synthesemechanismus, wie er von Kornberg(16) beschrieben wurde,nicht mehr aktuell,zumal Preiss und Handler (20,21) feststellen konnten,daß die sog.NAD-Synthetase,welche nach Kornberg die Bildung von NAD aus NAM und ATP katalysiert,mit dem Ferment identisch ist,welches die Bildung von Desamino-NAD aus Desamino-NAM und ATP ermöglicht.

Der Annahme,daß der von Kornberg(16) beschriebene Syntheseweg in vivo nicht erfolgt,entspricht auch unser Befund,daß das NAM kein Zwischenprodukt der NAD-Synthese sein kann,da das Maximum der spezifischen Radioaktivität mit dem des NAD zeitlich zusammenfällt.Noch nicht beschrieben wurde unser Befund,daß das NR aller Wahrscheinlichkeit nach ein Abbauprodukt des NAD ist.(Siehe Abschnitt VI)

Bei der Untersuchung der zweiten Metabolitgruppe stellt sich heraus, daß die GAPDH in vivo durch das Peroxyd geschädigt wird.Es kommt auch dann noch zum Anstau des Fermentsubstrates(TP),wenn man den NAD-Gehalt durch NA-Vorbehandlung nach der Peroxydgabe konstant hält. Der TP-Anstau war jedoch nicht so ausgeprägt wie nach Peroxydbehandlung allein.Man kann daraus schließen,daß zum größten Teil der Abfall des NAD die GAPDH-Reaktion limitiert,während zum geringeren Teil(ca.1/3) der Umsatz der Triosephosphate durch eine Direktschädigung des Fer-

mentes gestört wird.Die Erhöhung der FDP-Konzentration muß vor allem durch einen Rückstaueffekt von der Seite der Triosephosphate zustande kommen,sonst kann man nicht die starke Abhängigkeit des FDP-Spiegels vom NAD-Gehalt erklären.(Bei Vorbehandlung mit NA blieb der FDP-Anstau auf 10% des sonstigen Anstaus nach Peroxydgabe beschränkt)Wegen dieses Rückstaueffektes kann man nicht entscheiden,ob unter in-vivo-Bedingungen die Aldolase direkt durch das Peroxyd geschädigt wird.

Während,wie bereits erwähnt,das Azaserin(20,22) und das von Holzer(14) untersuchte Tetramin ebenso wie das Bis-hydroxymethyl-peroxyd die NAD-Synthese hemmen,berichtete Hilz(17,24),daß Röntgenstrahlen den NAD-Abbau in den Asciteszellen aktivieren,da bereits 10 Minuten nach Bestrahlung der NAD-Gehalt auf 50% abfällt.Hilz(17,24) benutzt die von Holzer ermittelte Halbwertszeit des NAD von 30-40 Minuten als Vergleichswert und kommt zu dem Schluß,daß eine Synthese-blockung allein nicht für den raschen Abfall verantwortlich sein kann.Nach obigen Versuchsergebnissen ist die biologische Halbwertszeit in vivo kürzer und liegt bei 10 Minuten,so daß die Blockierung der Synthese durchaus einen so raschen Abfall des NAD-Gehaltes zur Folge haben könnte.

Im Gegensatz zu obigen Befunden mit Bis-hydroxymethyl-peroxyd steht die Wirkungsweise einer N-Lostverbindung,die von Green und Bodansky (25) untersucht wurde.Nach Applikation dieser Substanz in vivo wurden die Fermentaktivitäten von 10 untersuchten Glycolysefermenten der Asciteszellen,darunter die GAPDH,nicht geändert.Dagegen wurde die Aktivität der NAD-ase gesteigert,als Folge sank der NAD-Gehalt der Zellen auf 30% ab.-Wenn Asciteszellen mit dem Peroxyd vorbehandelt werden,kann man in den Zellhomogenaten keine Aktivierung der NAD-ase feststellen.

Zusammenfassung

1.Nach Injektion von 1,5mg Bis-hydroxymethyl-peroxyd pro Ascitesmaus i.p.steigen die Konzentrationen von AMP,NA,FDP und TP in der Asciteszelle an,während diejenigen von NAD,ATP und den Gesamtpyridinnukleotiden abnehmen.Der Gehalt an NS,NAM und NR ändert sich nur wenig.

2.NAD,NA und NS werden in vitro durch das Peroxyd nicht angegriffen.

3.Die beobachteten Konzentrationsänderungen sind 6-8 Stunden nach der Injektion abgeklungen.

4.Die NAD-und NA-Spiegel in der Zelle werden bereits 5 Minuten nach der Peroxydapplikation geändert,während ATP erst nach 10 Minuten eine meßbare Änderung erfährt.Der NAD-Gehalt ist nach 10 Minuten bereits auf 50% des Ausgangswertes abgesunken.-Nach Vorbehandlung mit NA (10mg/Maus)bleiben die Konzentrationsänderungen von ATP und NAD nach Peroxydbehandlung aus,während FDP und TP auch dann angestaut werden,jedoch in viel kleinerem Masse als nach Peroxydbehandlung allein.

5.Die biologische Halbwertszeit des NAD beträgt in vivo in den Asciteszellen etwa 10 Minuten.

6.Bei Behandlung mit dem Peroxyd wurde die spezifische Aktivität von NAD und NR (Applikation von 4,5µC 14C-U-Glukose) etwa auf die Hälfte reduziert.Außerdem verschwindet die Radioaktivität aus diesen Verbindunge langsamer als bei der unbehandelten Kontrolle.Die Radioaktivität erscheint im NR erst 5 Minuten später als im NAD.

7.Ein stöchiometrischer Zusammenhang zwischen NAD-Abfall und NA-Anstau ist nachweisbar,zumindest innerhalb der ersten Stunde nach der Peroxydapplikation.

Abkürzungen

| | | | |
|---|---|---|---|
| FDP | Fruktose-1,6-diphosphat | NS | Nicotinsäure |
| NAD | Nicotinamiddinukleotid | NA | Nicotinamid |
| NAD-H | reduziertes NAD | TP | Triosephosphat |
| NAM | Nicotinamidmononukleotid | ATP | Adenosintriphosphat |
| TPN | Triphosphopyridindinukleotid | AMP | Adenosinmonophosphat |
| APPR | Adenosinpyrophosphatribosid | | |
| GPN | Gesamtpyridinnukleotide | | |
| NR | Nicotinamidribosid | | |

Desamino-NAD nicotinsäureanaloge Verbindung des NAD

Desamino-NAM nicotinsäureanaloge Verbindung des NAM

| | |
|---|---|
| GDH | Glycerophosphat-Dehydrogenase |
| ALD | Aldolase |
| TIM | Trioseisomerase |
| LDH | Lactat-Dehydrogenase |
| ADH | Alkohol-Dehydrogenase |
| GAPDH | Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase |

Verwendete Substanz:

Bishydroxymethyl-peroxyd

Mol.Gew. 94

Schmelzpunkt 62-64°C

Die Synthese erfolgte nach(26,27) und wurde von F.Schneider(28) modifiziert.

Schrifttumsverzeichnis


1) G.Weitzel,E.Buddecke u.F.Schneider,Hoppe-Seyler 323,215(1961)
2) G.Weitzel,E.Buddecke u.F.Schneider,Hoppe-Seyler 325, 65(1961)
3) G.Weitzel u. Mitarbeiter unveröffentlicht sowie
G.Weitzel u. W.Schaeg,Hoppe-Seyler 316,250(1959)
4) G.Weitzel u. E.Buddecke,Hoppe-Seyler 323,14(1961)
5) W.König,Journal für praktische Chemie 69,105(1904)
6) B.P.Lisboa,Naturwissenschaften 44,617(1957)
7) S.P.Colowick,N.O.Kaplan u.M.Ciotti,J.Biol.Chem.191,447(1951)
8) M.Ciotti u.N.O.Kaplan,Methods in Enzymologie III S.890
9) H.Busch,Metods in Enzymologie III S.431
10) R.B.Hurlbert,H.Schmitz et al.,J.Biol.Chem.209,23(1954)
11) H.Schmitz,W.Hart u.H.Ried,Zeitschr.Krebsforschung 60,301(1955)
12) H.Holzer,W.Duntze u.S.Frank,Angew.Chemie 70,746(1958)
13) H.Holzer,Kröger,H.W.Rotthauwe u.B.Ulrich,Biochem.Ztschr. 333,155(1960)
14) H.Holzer,Kröger,H.W.Rotthauwe u.B.Ulrich,Biochem.Ztschr. 333,148(1960)
15) G.Weitzel,F.Schneider,H.Pfeil u.K.Seynsche,Hoppe-Seyler 331,219(1963)
16) A.Kornberg,J.Biol.Chem.182,779(1950)
17) H.Hilz,M.v.Gossler,M.Oldekop u.M.Scholz,Biochem.and Biophys.Research
Communications Vol.6,Nr.5(1962)
18) O.Warburg,K.Gawelm u.A.-W.Geissler,Z.Naturforschung 12b,115(1957)
19) M.Mielsch,H.Grimmberg,U.Dold u.H.Holzer,Biochem.et Biophys.Acta
62,519(1962)
20) J.Preiss u.P.Handler,J.Biol.Chem.233,493(1958)
21) J.Preiss u.P.Handler,J.Biol.Chem.233,488(1958)
22) S.Narrod,V.Bonavita,E.Ehrenfeld u.N.Kaplan,J.Biol.Chem.
236,931(1961)
23) T.Langan,N.Kaplan u.L.Shuster,J.Biol.Chem.234,2161(1959)
24) H.Hilz,Hubmann,M.Oldekop,M.Scholz u.M.v.Gossler,Biochem.Ztschr.
336,62(1962)
25) S.Green u.O.Bodansky,J.Biol.Chem.237,1752(1962)
26) H.Wieland,A.Wingler ,Liebigs Ann.Chem.431,301(1923)
27) A.Kieche u. R.Meister,Ber.dtsch.chem.Gesellschaft 66, 718(1933)

## Lebenslauf

Am 24. August 1940 wurde ich in Böhmisch-Leipa (Sudetenland) als Sohn des Dr. med. Hermann Klominsky und dessen Ehefrau Rosalinde, geb. Richter-Kreuz, geboren. Nach dem zweiten Weltkrieg übersiedelten meine Eltern von meinem Geburtsort nach Unterböbingen, Landkreis Schwäbisch Gmünd, wo sich mein Vater als praktischer Arzt betätigte. Dort ging ich von 1946 bis 1950 in die Volksschule, um dann von 1950 an 9 Jahre lang das Parler-Gymnasium in Schwäbisch Gmünd zu besuchen.

Im Frühjahr 1959 begann ich nach der Reifeprüfung das Medizinstudium an der Universität in Tübingen. Ohne den Studienort zu wechseln, legte ich 1960 das Vorphysikum und 1961 das Physikum ab. Nach dem Physikum begann ich im Herbst 1961 mit den Experimenten meiner Doktorarbeit im Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Tübingen, die im September 1962 abgeschlossen wurden. Bis zum Mai 1963 arbeitete ich weiterhin in demselben Institut. Im Dezember 1964 legte ich in Tübingen mein Staatsexamen ab.